临床研究

*GABRB2*基因启动子区单核苷酸多态性与精神分裂症的关联

周 林[1],宗 璐[1],张璐璐[2],邓 聪[3],赵存友[1]

[1]南方医科大学基础医学院遗传学教研室,广东 广州 510515;[2]广州市第一人民医院精神心理科,广东 广州 510180;[3]广州医科大学附属第二医院,广东 广州 510260

摘要:目的 精神分裂症是一种多基因遗传性重型精神病。我们前期工作已经发现γ-氨基丁酸(GABA)A型受体β2亚基基因(*GABRB2*)内含子8和9内多个单核苷酸多态性(SNPs)与精神分裂症相关。本项研究探*GABRB2*基因启动子区的多态性与精神分裂症的相关性。**方法** 采用特异性PCR引物扩增*GABRB2*基因启动子区(包含多个SNPs),并采用Sanger DNA测法对扩增的PCR产物进行序列测定,以获得待检SNPs的基因型;采用SHEsis软件进行Hardy-Weinberg平衡分析和SPSS软件进行SNPs基因型和等位基因频率在对照组和疾病组之间的差异分析。**结果** 对172例精神分裂症患者和167例正常人对照分析结果发现rs3811996与疾病显著相关:其杂合基因型(A/G)频率在疾病组显著低于对照组;在男性样本中,其A/G基因型和次要等位基因G频率均显著低于对照组。**结论** 本项研究表明*GABRB2*基因启动子区SNP rs3811996可能为男性偏执型精神分裂症的保护因子, 支持了*GABRB2*基因对精神分裂症的易感性。

关键词:精神分裂症;*GABRB2*基因;启动子;单核苷酸多态性

Association of single nucleotide polymorphisms in the promoter of GABA$_A$ receptor β2 subunit gene with schizophrenia

ZHOU Lin[1], ZONG Lu[1], ZHANG Lulu[2], DENG Cong[3], ZHAO Cunyou[1]

[1]Department of Medical Genetics, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; [2]Department of Psychology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510180, China; [3]Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China

Abstract: Objective To investigate the genetic association between schizophrenia and the polymorphism of GABA$_A$ receptor β2 subunit (*GABRB2*) gene. **Methods** A population association analysis was performed of 5 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the proximal promoter of *GABRB2* gene by PCR and sequencing of the genomic DNA in a cohort of 172 schizophrenics and 167 controls of Chinese Han nationality. **Results** One out of the 5 SNPs, namely rs3811996, was found to be significantly associated with schizophrenia especially in the male cohorts, where the heterozygous genotypes (A/G) and minor allele G displayed lower frequencies in case group than in the controls. **Conclusion** We found a new risk, SNP rs3811996, for paranoia schizophrenia, which further supports the importance of genetic variations of *GABRB2* in the etiology of schizophrenia.

Key words: schizophrenia; *GABRB2* gene; promoter; single nucleotide polymorphism

精神分裂症是一类发病率为1%的重型慢性精神病。家系、双生子研究表明,精神分裂症是遗传度约为0.70%~0.85%的复杂多基因遗传病[1]。虽然该疾病的具体分子发病机制仍未明了,但普遍认为遗传和环境因素对疾病的发生发展起着共同作用[2]。多项研究已发现多巴胺、谷氨酸和5-羟色胺等多种神经递质的异常与精神分裂症的发病相关[3]。其中,γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)类神经递质和精神分裂症发病的相关性首次在1970年初被报道[4],随后多项研究报道了γ-氨基丁酸能系统(GABAergic)对精神疾病发病起着重要的作用[5]。

GABA是脊椎动物中枢神经系统主要的抑制性神经递质。中枢神经系统中快速的突触抑制性递质传递是由A型GABA受体家族(GABA$_A$ receptors, GABR)组成的氯离子通道介导的[6]。GABR是由α1-α6、β1-β3、γ1-γ3、ρ1-ρ3、σ、ε、δ和π多个亚基组成的多聚体复合物,而α1、β2、γ2亚基是组成功能性受体的主要组分[7]。该受体的多个编码基因*GABRA1*、*GABRA6*、*GABRB2*和*GABRP*与精神分裂症的相关性已有报道[8]。其中β2亚基是由一个由11个外显子组成的,长度约为250 kb的*GABRB2*基因(GABA$_A$ receptor β2 subunit gene)编码[9]。*GABRB2*内含子8和内含子9内的多个SNPs(single-nucleotide polymorphisms)与中国汉族人群病发精

收稿日期:2014-06-23

基金项目:国家自然科学基金(81371475);广东省自然科学基金(S2012010009664);广东省教育厅人才启动基金(2050205);高等学校博士学科点专项科研基金(20124433120026)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81371475).

作者简介:周 林,硕士研究生,E-mail: zzzhou1219@163.com

通信作者:赵存友,博士,博士生导师,E-mail: cyzhao@smu.edu.cn

神分裂症的相关联首次被Lo等报道[10]，之后被其它研究组在不同种群中相继得到了阳性验证[8, 11-12]。这些疾病相关SNPs与该基因的RNA表达和表观遗传修饰的相关性在精神分裂症中发生了异常进一步表明了*GABRB2*基因在精神分裂症发病过程的重要性[9, 13-141]。现有的关于*GABRB2*基因的功能性研究主要集中在内含子区域，而对基因调控起重要作用的启动子区的研究还甚少。本研究将对*GABRB2*基因启动子区的SNPs与精神分裂症的关联性进行检测。

1 对象和方法

1.1 对象

精神分裂症外周血样本采自于广州医科大学附属脑科医院。共172例，平均年龄为47.3±13.5岁，其中男性92例，女性80例。依据美国《精神疾病诊断与统计手册》(The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-IV)标准诊断为偏执型，且都表现为阳性症状；无重大躯体疾病史及脑器质性障碍，无药物或者酒精依赖。对照组为健康体检无亲缘关系的个体(采自广州医科大学附属第二医院)，共167名，平均年龄为35.5±9.1岁，其中男性89名，女性78名；排除梅毒、肝炎等传染性疾病个体。所有受试个体均由本人或直系亲属知情同意后签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 受试血样均为晨起空腹抽取的外周静脉血，EDTA抗凝管4 ℃保存待用。采用标准酚-氯仿方法抽提外周血白细胞DNA，并溶于pH为8.0的TE溶液中放置−20 ℃保存备用。

1.2.2 DNA扩增和序列测定 长度为1690 bp的DNA片段位于*GABRB2*基因第一个外显子上游1000 bp至下游624 bp为本项研究的目标区域。采用Primer premier 6.0软件设计引物扩增该区域。上游引物序列为：ATCCATCCCAGAGGAGCTGTC；下游引物序列为：CCAGGGGACTCGCACACCCAG。按照TOYOBO公司的KOD FX Polymerase PCR扩增试剂盒的条件在25 μl反应体系中进行：0.5 U KOD FX polymerase，12.5 μl 10×PCR buffer，5 μl 25 mmol/L dNTPs Mix，0.75 μl 5 μmol/L primers 和 50 ng DNA模板。PCR反应在Applied Biosystems 2720 Thermal cycler首先进行95 ℃处理3 min；然后按照以下条件运行30个循环：98 ℃处理30 s，55 ℃处理30 s，68 ℃处理1 min；最后68 ℃处理5 min。

PCR扩增完成后，扩增产物经由EB显色的2%琼脂糖凝胶电泳验证正确后送Life Technology公司进行Sanger测序。测序引物为PCR扩增所用的上游引物。测序结果采用BioEdit软件读取和比对，以发现目标片段内存在的SNPs及其碱基类型。

1.2.3 数据处理 采用SHEsis软件分析基因型分布是否符合Hardy-Weinberg平衡定律[15]。利用SPSS13.0软件中的χ^2检验病例-对照两组间等位基因和基因型频率的差异；如频数小于5采用Fish精确检验，计算比数比(odds ratio, OR)及95%可信区间(confidence interval, CI)。各种检验均以$P<0.05$为显著差异性阈值。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg遗传平衡检验

通过对启动子区1690 bp扩增片段内的测序结果序列分析，并同NCBI和UCSC数据库中的SNPs进行比对后发现，本研究中的样本中存在以下5个SNPs：rs72815526、rs3811997、rs76774144、rs3816596和rs3811996。这5个SNPs的基因型频率经Hardy-Weinberg遗传平衡检验，病例和对照组样本的基因频率分布均达到遗传平衡，如表1所示，说明本研究所用样本有良好的人群代表性。

表1 疾病组和对照组基因型Hardy Weinberg遗传平衡检测

Tab.1 Hardy-Weinberg analysis

SNP	Group	χ^2	υ	*P*
rs72815526	SCZ	0.88	1	0.35
	CON	2.45	1	0.12
rs3811996	SCZ	2.203	1	0.138
	CON	1.072	1	0.300
rs3811997	SCZ	0.42	1	0.66
	CON	2.13	1	0.15
rs76774144	SCZ	0.37	1	0.54
	CON	2.02	1	0.16
rs3816596	SCZ	1.55	1	0.21
	CON	1.15	1	0.28

υ: degree of freedom; SCZ: schizophrenia; CON: non-psychatric control.

2.2 SNPs与疾病的相关性分析

对5个SNPs的基因型以及等位基因频率在疾病组和对照组之间的差异分析结果如表2所示。SNP rs3811996的基因型频率在疾病组和对照组之间差异显著：杂合子基因型(A/G)频率在疾病组中显著低于对照组(P=0.02)；但其等位基因频率在疾病和对照组之间无统计学差异。当把女性个体分离出去后(表3)，结果显示男性样本中SNP rs3811996基因型和等位基因两个水平的分布频率在疾病组和对照组之间均呈现显著差异：杂合子基因型A/G频率在疾病组低于对照组(P=0.03)；等位基因G频率在疾病组也显著低于对照组(P=0.03)。其它4个SNPs无显著差异。

3 讨论

精神分裂症是一种常见的多基因人类遗传病，近年

表2 疾病组与对照组五个SNP位点基因型和等位基因频率分布

Tab.2 Genotypic and allelic frequencies of 5 SNPs between schizophrenia group and control group

Group	Genotype (*n*, %)			Allele (*n*, %)	
	CC	CA	AA	C	A
rs72815526					
SCZ (172)	149 (86.63%)	23 (13.37%)	0	321 (93.31%)	23 (6.69%)
CON (167)	140 (83.83%)	24 (14.37%)	3 (1.80%)	304 (91.02%)	30 (8.98%)
OR (95% CI)	1	1.11 (0.60-2.06)	N/A	1	1.38 (0.78-2.42)
P		0.74	0.12		0.27
rs3811996	AA	AG	GG	A	G
SCZ	107 (62.21%)	53 (30.81%)	12 (6.98%)	267 (77.33%)	78 (22.67%)
CON	85 (50.90%)	72 (43.11%)	10 (5.99%)	242 (72.75%)	91 (27.25%)
OR (95% CI)	1	1.71 (1.09-2.70)	1.03 (0.42-2.49)	1	1.28 (0.90-1.81)
P		***0.02***	0.96		0.17
rs3811997	CC	CT	TT	C	T
scz	152 (88.37%)	20 (11.63%)	0	324 (94.19%)	20 (5.81%)
con	146 (87.43%)	19 (11.38%)	2 (1.19%)	311 (93.11%)	23 (6.89%)
OR (95% CI)	1	0.99 (0.51-1.93)	N/A	1	1.20 (0.65-2.23)
P		0.97	0.24		0.57
rs76774144	GG	GA	AA	G	A
SCZ	130 (75.58%)	38 (22.09%)	4 (2.33%)	298 (86.63%)	46 (13.37%)
CON	128 (76.65%)	34 (20.36%)	5 (2.99%)	290 (86.83%)	44 (13.17%)
OR (95% CI)	1	0.91 (0.54-1.53)	1.27 (0.33-4.84)	1	0.98 (0.63-1.53)
P		0.72	0.75		0.94
rs3816596	GG	GA	AA	G	A
SCZ	64 (37.21%)	88 (51.16%)	20 (11.63%)	216 (62.79%)	128 (37.21%)
CON	59 (35.33%)	86 (51.50%)	22 (13.17%)	204 (62.79%)	130 (38.91%)
OR (95%CI)	1	1.06 (0.67-1.68)	1.19 (0.59-2.41)	1	1.08 (0.79-1.47)
P		0.80	0.62		0.65

The differences between SCZ and CON in genotypic and allelic frequencies of 5 SNPs were calculated with the χ^2 of 2×2 table. *P*-values were given in bold-face <0.05 (significant).

表3 男性疾病组和对照组间rs3811996位点基因型和等位基因频率分布

Tab.3 Associations of SNP rs3811996 with the male schizophrenia

Group	Genotype (*n*, %)			Allele (*n*, %)	
rs3811996	AA	AG	GG	A	G
SCZ	57 (61.96%)	29 (31.52%)	6 (6.52%)	143 (77.72%)	41 (22.28%)
CON	40 (44.94%)	40 (44.94%)	9 (10.12%)	120 (67.42%)	58 (32.58%)
OR (95% CI)	1	1.97 (1.05-3.68)	2.14 (0.71-6.48)	1	1.69 (1.06-2.69)
P		***0.03***	0.17		***0.03***

The differences between SCZ and CON in genotypic and allelic frequencies of 5 SNPs were calculated with the χ^2 of 2×2 table. *P*-values were given in bold-face <0.05 (significant).

来的研究已经发现了多个诸如DISC1[16]、COMT[17]、NRG1[18]以及本文所报道的*GABRB2*等易感基因[19]。其中*GABRB2*基因易感性的报道主要体现在其内含子8和9的多个SNPs基因型和单倍型在中国汉族人群以及日本[20]、美国、德国[21]和葡萄牙[8]等多个种族人群病发精神分裂症相关联。本项研究首次发现*GABRB2*启动子区内与精神分裂症相关的SNP，拓宽了*GABRB2*基因对精神分裂症易感性的证据。非编码区SNPs的作用主要是调控基因的转录和剪接。之前发现的*GABRB2*基因与疾病相关的SNPs均在内含子8和9中，该区域不但是一个由多个SNPs组成的DNA重组热点（recombination hot spot）[22]，也是一个进化上相对保守的富含CG二核苷的Alu转座子元件（Alu-Yi6 element）[23]。区域内的SNPs不但影响DNA的重组[22]，同时个别SNPs的等位基因在

亲代向患病子代传递过程中出现父源不平衡传递现象[24];有些SNPs还与CpG位点重合,从而影响了DNA的甲基化。在RNA水平,SNPs基因型的变化不但影响其转录和剪接[9, 13],而且等位基因表达不均衡的异常印记造成了杂合子个体RNA表达异常降低[24]。而本研究发现位于启动子区内的SNP rs3811996,其杂合等位基因型A/G在疾病组中的频率显著低于对照组,并且在男性病患人群中更为明显;而其次要等位基因G的频率在疾病组也低于疾病组,虽然未达到显著水平,但在男性病患人群中却达到了显著水平。这种性别的差异可能与表观遗传印记有关。事实上之前发现的位于内含子内SNPs与疾病的相关性也是在男性个体中表现更为明显[9, 14],尤其遗传印记现象也在男性中更为突出[24]。启动子区的碱基序列变化对基因的调控作用比其他区域更为直接。本研究中发现的疾病相关SNP rs3811996是否通过碱基的变化影响基因的转录、剪接,或者通过DNA甲基化或组蛋白修饰变化影响启动子转录活性,需要进一步的功能试验探索和验证。

总之,本研究首次报道了*GABRB2*基因启动子区的SNP与精神分裂症相关。这一发现不但进一步支持了*GABRB2*基因对精神分裂症的易感性,同时也为进一步研究*GABRB2*基因的表达调控机制及其参与的发病机制奠定了基础。

参考文献:

[1] Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics C, Genetic Risk Outcome of Psychosis C. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis[J]. Lancet, 2013, 381(9875): 1371-9.
[2] Pidsley R, Mill J. Epigenetic studies of psychosis: current findings, methodological approaches, and implications for postmortem research[J]. Biol Psychiatry, 2011, 69(2): 146-56.
[3] Kirov G, O'donovan MC, Owen MJ. Finding schizophrenia genes[J]. J Clin Invest, 2005, 115(6): 1440-8.
[4] Roberts E. Prospects for research on schizophrenia. An hypotheses suggesting that there is a defect in the GABA system in schizophrenia[J]. Neurosci Res Program Bull, 1972, 10(4): 468-82.
[5] Guidotti A, Auta J, Chen Y, et al. Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder[J]. Neuropharmacology, 2011, 60(7/8): 1007-16.
[6] Mehta AK, Ticku MK. An update on GABA(A) receptors[J]. Brain Res Brain Res Rev, 1999, 29(2/3): 196-217.
[7] Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P. Segregation of different GABA(A) receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells[J]. J Neurosci, 1998, 18(5): 1693-703.
[8] Petryshen TL, Middleton FA, Tahl AR, et al. Genetic investigation of chromosome 5q GABA(A) receptor subunit genes in schizophrenia[J]. Mol Psychiatry, 2005, 10(12): 1074-88, 1057.
[9] Zhao C, Xu Z, Chen J, et al. Two isoforms of GABA(A) receptor β2 subunit with different electrophysiological properties: differential expression and genotypical correlations in schizophrenia[J]. Mol Psychiatry, 2006, 11(12): 1092-105.
[10] Lo WS, Lau CF, Xuan Z, et al. Association of SNPs and haplotypes in GABA(A) receptor beta2 gene with schizophrenia[J]. Mol Psychiatry, 2004, 9(6): 603-8.
[11] Liu JX, Shi YY, Tang W, et al. Positive association of the human GABA(A) receptor β2 subunit gene haplotype with schizophrenia in the Chinese Han population[J]. Biochem Biophy Res Commun, 2005, 334(3): 817-23.
[12] Lo WS, Harano M, Gawlik M, et al. *GABRB2* association with schizophrenia: commonalities and differences between ethnic groups and clinical subtypes[J]. Biol Psychiatry, 2007, 61(5): 653-60.
[13] Zhao C, Xu Z, Wang F, et al. Alternative-splicing in the exon-10 region of GABA(A) receptor β2 subunit gene: relationships between novel isoforms and psychotic disorders[J]. PLoS One, 2009, 4(9): e6977.
[14] Zhao C, Wang F, Pun FW, et al. Epigenetic regulation on *GABRB2* isoforms expression: developmental variations and disruptions in psychotic disorders[J]. Schizophr Res, 2012, 134(2/3): 260-6.
[15] Wang YJ, Huang JM, Xia P, et al. Genetic variations of HSBP1 gene and its effect on thermal performance traits in Chinese Holstein cattle[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(6): 3877-82.
[16] Hennah W, Varilo T, Kestila M, et al. Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(23): 3151-9.
[17] Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia[J]. Am J Hum Genet, 2002, 71(6): 1296-302.
[18] Tosato S, Dazzan P, Collier D. Association between the neuregulin 1 gene and schizophrenia: a systematic review[J]. Schizophr Bull, 2005, 31(3): 613-7.
[19] Lo WS, Lau CF, Xuan Z, et al. Association of SNPs and haplotypes in GABA(A) receptor β2 gene with schizophrenia[J]. Mol Psychiatry, 2004, 9(6): 603-8.
[20] Lo WS, Harano M, Gawlik M, et al. *GABRB2* association with schizophrenia: commonalities and differences between ethnic groups and clinical subtypes[J]. Biol Psychiatry, 2007, 61(5): 653-60.
[21] Yu Z, Chen J, Shi H, et al. Analysis of *GABRB2* association with schizophrenia in German population with DNA sequencing and one-label extension method for SNP genotyping[J]. Clin Biochem, 2006, 39(3): 210-8.
[22] Ng SK, Lo WS, Pun FW, et al. A recombination hotspot in a schizophrenia-associated region of *GABRB2*[J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9547.
[23] Lo WS, Xu Z, Yu Z, et al. Positive selection within the Schizophrenia-associated GABA(A) receptor β2 gene[J]. PLoS One, 2007, 2(5): e462.
[24] Pun FW, Zhao C, Lo WS, et al. Imprinting in the schizophrenia candidate gene *GABRB2* encoding GABA(A) receptor β2 subunit[J]. Mol Psychiatry, 2011, 16(5): 557-68.

(编辑:孙昌朋)